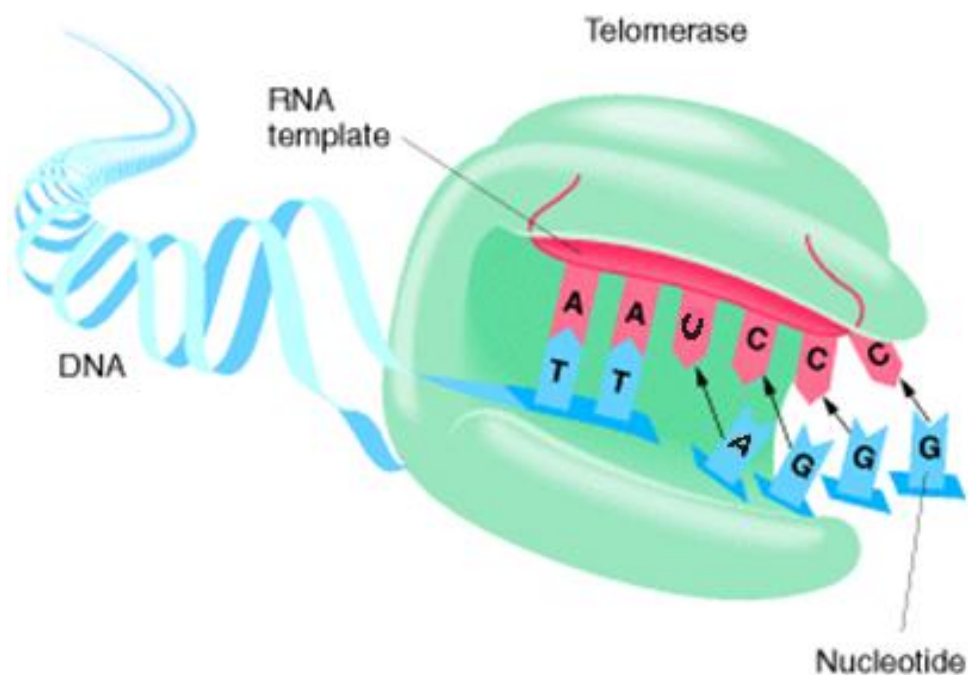


# Telomerase

-

## *et potensielt angrepspunkt i kampen mot kreft*

Forfattet av Ida Marie Karlstad og Nicolai Tell (kull v07)  
Veileder: Professor Dr. Med. Trond Buanes.



Prosjektoppgave ved det Medisinske Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

27.02.12

# Innholdsfortegnelse

---

	<b>Side</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Innledning</b>	<b>4</b>
<b>Metode</b>	<b>8</b>
<b>Resultater</b>	<b>10</b>
<b>Diskusjon</b>	<b>19</b>
<b>Konklusjon</b>	<b>24</b>
<b>Referanseliste</b>	<b>24</b>

# Abstract

---

**Background:** Telomerase is a necessity for infinite cell division in cancer cells, and high telomerase activity is present in as much as 90 % of human cancers. Hence telomerase has become an attractive target in cancer therapy because it suggests a universal cure for cancer. We summarized research done on the vaccine GV1001 and the telomerase inhibitor Imetelstat in prostate, pancreas and lung cancer. **Methods:** We reviewed finished and ongoing clinical trials on GV1001 and Imetelstat; and preclinical trials on Imetelstat. **Results:** Preclinical trials on Imetelstat show that it is a potent inhibitor of cancer growth. It also targets tumor initiating cells (TIC). Clinical trials on GV1001 have shown that it's a safe treatment. It also induces immune response in majority of patients and phase I/II studies suggest an increased overall survival in the immune responders. Even though one clinical phase III trial on GV1001 has shown negative results, other studies suggest a positive additive effect when combined with chemo and radiotherapy. **Conclusion:** Therapy targeting telomerase is safe. We believe telomerase-targeted therapy can be an important supplement to other cancer therapy even though it doesn't seem promising as single treatment.

# Innledning

---

Telomerase er et enzym som utmerker seg ved at det skiller kreftceller fra andre celler. Aktivisering av telomerase er essensielt i kreftutviklingen, og enzymet er helt grunnleggende for kreftcellenes u dødelige fenotype (1). Med unntak av kjønnsceller (sædceller, eggceller), stamceller (i benmarg, hud, GI-traktus) og aktiverte lymfocytter, ser det ut som at øvrige somatiske celler i menneskekroppen utviser liten eller ingen telomeraseaktivitet (2). Av denne grunn har telomerase blitt utpekt som et mulig angrepspunkt i kampen mot kreft, og de mest optimistiske ser på dette som en mulighet for en universell kur for kreftsykdommer. Det er dette som er hovedårsaken til at vi har valgt å skrive om akkurat telomerase i prosjektoppgaven vår.

I denne oppgaven vil vi gå inn på hvorvidt telomaserettet behandling virkelig er like lovende som det forskere har antydnet; bedømt ut fra litteraturen som foreligger på området.

## Bakgrunn

Telomerer er repetitive DNA-sekvenser av basene TTAGGG på enden av DNA-tråden som sammen med shelterin-komplekset (som består av stabiliserende proteiner) sørger for stabilitet i DNA (1- 4). Dette er nødvendig pga at DNA-polymerase, enzymene som replikerer DNA, ikke er i stand til å replikere de siste baseparene i DNA-tråden. Telomereene fungerer derved som en buffer ved at det kun er deler av de ikke-kodende telomereene som ikke lar seg replikere ved hver celledeling. Allikevel blir telomereene i somatiske celler stadig kortere. Lengden av telomereene i humane celler er ved fødselen ca 15-20 kb, og på grunn av DNA-polymerases manglende evne til å replikere enden av DNA-tråden vil man ved hver celledeling miste opp til 50-200 nukleotider av telomerasekvensen (4). Etter en rekke celledelinger, typisk ~60-80, blir de så korte at man nærmer seg et punkt hvor det vil gå ut over de kodende DNA-sekvensene. Disse korte telomereene vil dermed utløse noe man referer til som et "senescence"- eller alderdomsprogram, hvilket fører til veksthemming og i ytterste konsekvens programmert celledød; apoptose (2). Det er bl.a. mediatorer som p53 og Rb som deltar i denne prosessen, og innaktivering av disse er også viktige ledd i kreftutvikling (2). Dette er riktignok utenfor vår oppgave å gå nærmere inn på, og vil av den grunn ikke utdypes nærmere her.

## Struktur og oppbygning av selve enzymet

Forståelsen av enzymets og telomereenes intrikate struktur er viktig for forståelsen av fremstillingen som følger, derfor har vi valgt å inkludere ytterligere noen detaljer.

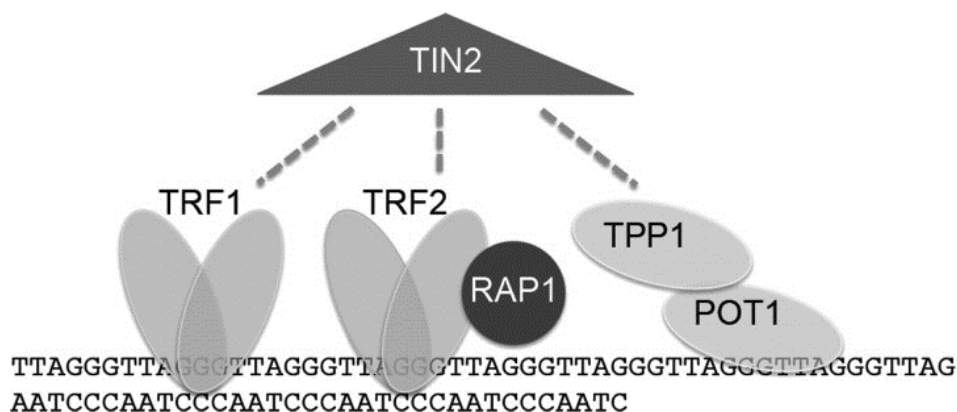
### Telomereene og shelterin-komplekset

Telomereene består som nevnt av repetitive sekvenser av basene TTAGGG, samt deres matchende DNA-sekvens AATCCC på den motsatte DNA-tråden. I enden av telomereene finner man også en såkalt t-loop fra 3' enden av tråden. T-loopen er en sløyfe som utgjøres av den enkeltrådede basesekvensen som blir igjen på enden av telomereene. Denne bøyer seg da tilbake og stabiliseres ved hjelp av

shelterin-komplekset. På denne måten unngås løse ender, hvilket kunne blitt oppfattet som dobbelttrådet DNA-brudd av DNA-reparasjonsenzymene (2).

Shelterin-komplekset består av seks proteiner. TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 og RAP1. TRF1 og TRF2 binder seg til dobbelttrådede telomersekvenser, mens TPP1 og POT1 binder den enkelttrådede t-loopen. RAP1 binder seg til TRF2, og TIN2 er med på å stabilisere hele komplekset (se figur 1). Til sammen er disse proteinene viktige for stabilisering av telomerene, samt trolig også regulering av telomeraseaktivitet i cellen (2,4,5).

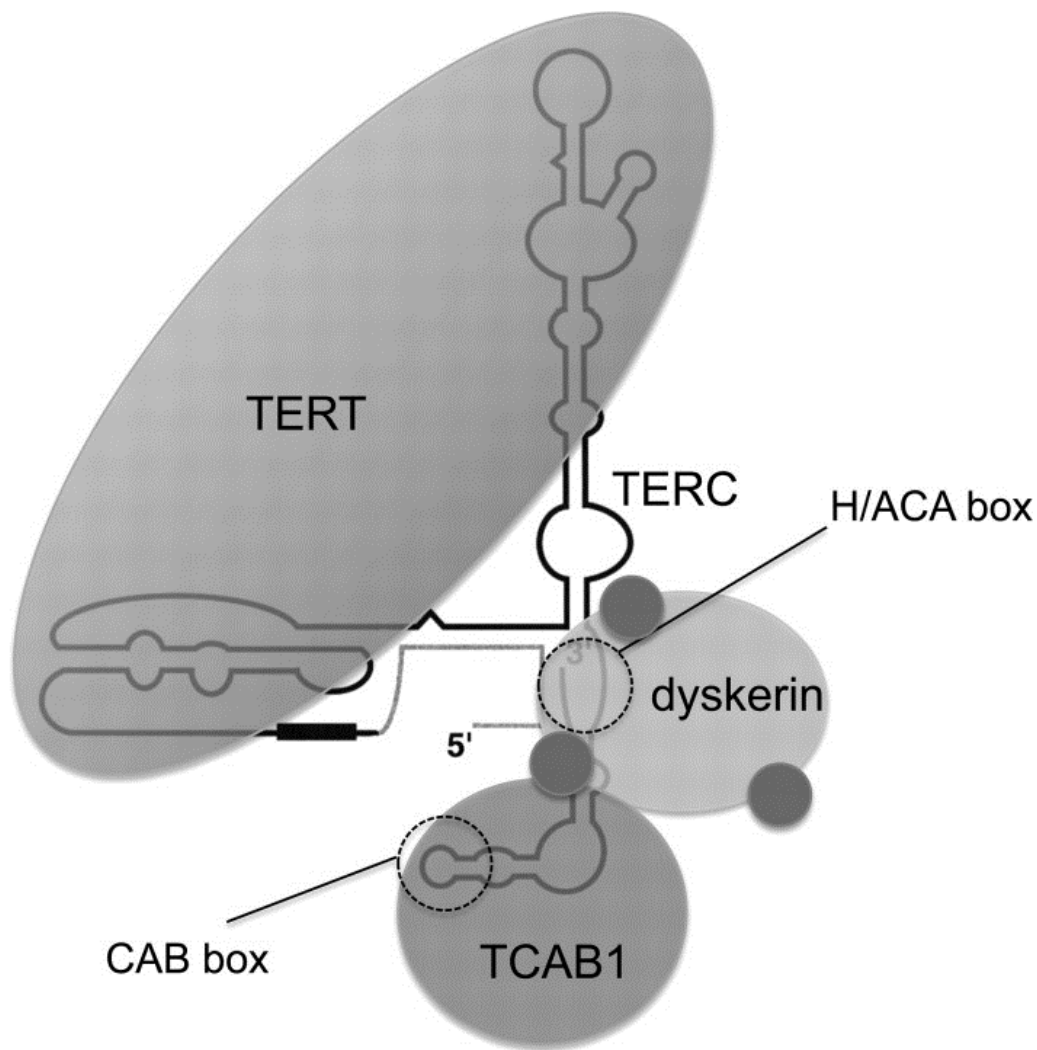
**Figur 1:** Telomerer med shelterin-komplekset:



### Telomerase

Telomerase er en revers transkriptase. Den katalytiske kjernen utgjøres av hTERT, som er selve den reverse transkriptasen, og hTERC som er telomerase RNA som fungerer som templat når telomerene skal dannes (se figur 2). I tillegg består enzymet av en rekke proteiner (dyskerin med tre assosierte tilleggsproteiner; NHP2, NOP10 og GAR1, samt TCAB1) som er viktige for formasjonen og den tredimensjonale strukturen til enzymet (2). Det er hTERT og hTERC som er angrepspunktene som viser mest lovende resultater i studier, og det er også disse vi kommer til å fokusere på i prosjektoppgaven.

**Figur 2:** Strukturen til telomerase:



### Telomerasefunksjon, samt metoder for å hemme celler med telomerase

Som nevnt vil somatiske celler gjennomgå apoptose etter et visst antall celledelinger (når telomerene blir for korte, se over). Kjønnsceller og stamceller har unngått dette problemet ved at de uttrykker telomerase. Telomerase fungerer ved å koble på repetitive sekvenser av basene TTAGGG på endene av DNA-trådene, og på denne måten stabiliseres DNA-tråden gjennom utallige celledelinger. Slik klarer altså kreftcellene å unngå apoptose ved aktivering av telomerase. Studier har vist at så mye som 85-90 % av alle kreftceller uttrykker telomerase (6-9), og dette har vist seg å være uavhengig av krefttype (9-11). Det er den katalytiske subenheten av telomerase; human telomerase revers transkriptase (hTERT), som er den hastighetsbegrensende delen av telomerasemolekylet (11), og av den grunn var det hTERT som ble utpekt som det mest attraktive angrepspunktet. De to metodene som det har blitt forsket mest på per dags dato er telomerasehemming vha et medikament kalt Imetelstat (GNR163L), samt en kreftvaksinasjonsteknikk utført med en bestanddel av hTERT; GV1001 (5). Disse to angrepsmåtene blir fokus for oppgaven.

### Imetelstat

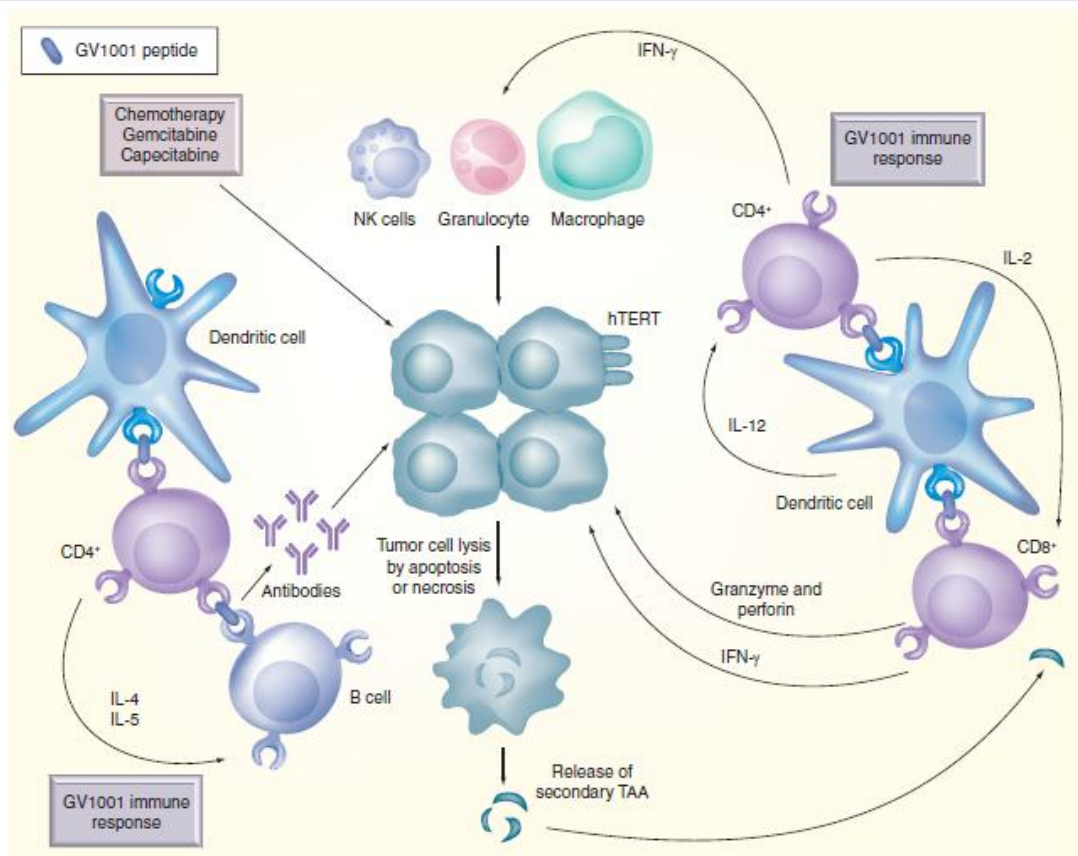
Imetelstat (GNR163L) er et oligonukleotid som har en høy affinitet og spesifisitet for templatregionen av RNA-subenheten av telomerase (hTERT) (se figur av telomerase over) (5). GNR163L er et 13-mer oligonukleotid N3'-P5' tiofosforamid som er kovalent bundet til et lipidmolekyl (derav L) (9). Som følge av lipidmolekylet har substansen en veldig god evne til å penetrere cellemembraner, og kan dermed penetrere normale og ondartede celler (9).

Imetelstat er altså en hemmer av selve enzymet, og ved å binde seg til telomerase forhindrer det telomerase i å forlenge telomerene i cellen.

### GV1001

GV1001 er et syntetisk 16-mer peptid som korresponderer til hTERT sin aminosyresekvens 611-626 (5,6). Tanken er at ved å sprøyte dette inn i huden etter forutgående injeksjon med GM-CSF (granulocyt/makrofag-kolonistimulerende faktor), et stoff som sørger for amplifisering av dendritiske celler i området, vil man kunne forårsake en immunreaksjon mot celler som uttrykker telomerase. GV1001-peptidet, som nevnt består av en del av selve telomerase-enzymet, vil dermed tas opp av dendritiske celler i huden. Disse antigenpresenterende cellene vil deretter vandre til regionale lymfeknuter, hvoretter immunforsvaret kan igangsette en reaksjon mot celler som produserer telomerase. Dette er grunnen til at denne teknikken går under navnet "vaksinasjon" (7).

**Figur 3:** GV1001 sin virkningsmåte:



Figuren viser hvordan GV1001 sørger for en immunrespons. hTERT = human telomerase revers transkriptase; NK cells = natural killer cells; TAA = tumor-associated antigen.

Det har også vært utført lignende vaksinasjonsstudier med tilsvarende sekvenser fra andre deler av TERT, for eksempel I540 og 572Y mot bl.a. NSCLC (ikke-småcellet lungekarsinom) og prostatakreft (12). GV1001 er det eneste av peptidene det forskes på per dags dato som er i stand til å utløse både en CD4<sup>+</sup>- og en CD8<sup>+</sup>-respons (12). Dette er mye av grunnen til at denne er mest lovende, og en av årsakene til at vårt hovedfokus vil dreie seg om akkurat denne vaksinasjonsmetoden.

### Forhold rundt kreftceller og stamceller

Det som ville kunne revolusjonert kreftbehandlingen i dag var spesifikk behandling rettet mot cellemekanistiske prosesser som skiller kreftceller fra andre celler. Hovedproblemet med dagens behandling (cellegift, strålebehandling) er at denne også dreper kroppens friske celler. Det er derfor telomerase har blitt frontet som en terapeutisk mulighet man kan utnytte cellebiologisk til å drepe kreftcellene spesifikt uten for mye bivirkninger på kroppens øvrige celler.

Det har blitt vist at enkelte kreftceller har stamcellelignende egenskaper, og disse refererer man gjerne til som tumor initiating cells; TIC, eller cancer stem cells; CSC (3,10). Denne subpopulasjonen av svulsten tror man fungerer tilsvarende kroppens øvrige stamceller; altså ved at den gir opphav til nye celler i vevet. Dagens cellegiftbehandling tar som regel ikke knekken på TIC/CSC. Dette medfører at kreftpasientene blir bedre på grunn av cellegiften (som hemmer veksten av selve svulsten) en kort periode, for så å få tilbakefall senere i forløpet pga at TIC overlever kjemoterapi (13).

Et annet viktig biologisk poeng er forskjellen på TIC/CSC og øvrige stamceller i kroppen vår. Forskning har vist at telomereene gjerne er kortere hos TIC enn de er hos somatiske stamceller (3,9). Vi vil senere komme tilbake til hvorvidt dette kan ha terapeutisk betydning.

## Metode

---

Søket etter litteratur på området ble hovedsakelig gjort i januar/februar 2012. Søkene våre ble gjort i Pubmed og Embase.

Vi begynte med å søke i Pubmed på "Telomerase AND cancer". Vi leste noen av de nyeste oversiktsartiklene, og begrenset deretter søket til GV1001 og Imetelstat; da dette er de telomeraserettete behandlingene som har kommet lengst på forskningsfronten.

Vi søkte både i Pubmed og Embase på GV1001 og Imetelstat.

Når det gjelder Imetelstat søkte vi på "Imetelstat NOT motesanib" (motesanib er en VEGF-hemmer det også har blitt forsket mye på i forbindelse med kreftbehandling, og mesh-ordene koblet dette mot Imetelstat).

Vi sammenlignet resultatene litt, og i samråd med veileder prøvde vi å finne krefttyper som var forsket på innenfor begge behandlingsalternativer. Vi stod da igjen med tre krefttyper: Pankreaskreft, prostatakreft og lungekreft. Det er altså disse tre krefttypene vi har valgt å inkludere i denne litteraturstudien.



To av artiklene (Bernhardt et al. 2006 og abstractet om PrimoVax fra 2009) ble anbefalt av veileder.

Vi søkte også i ClinicalTrials.gov etter både pågående og avsluttede kliniske studier med GV1001 og Imetelstat.

I tillegg gikk vi gjennom referanselistene i studiene vi inkluderte på leting etter andre relevante studier.

Totalt satt vi da igjen med 18 artikler, hvorav 7 er originalartikler (3 på Imetelstat, 4 på GV1001 hvor den ene kun foreligger som Abstract fra ASCO 2009) og resten er review-artikler samt artikler som tar for seg bakgrunnen for telomeraseforskning. I tillegg tilkommer informasjon om foreløpige ikke-publiserte pågående studier.

### **Forklaring på ulike typer studier**

Mulige legemidler testes først ut in vitro (i cellekulturer med friske celler og kreftceller) for å se om de har den virkningen man forventer. Forsøkene vil så fortsette in vivo på dyremodeller, før man til slutt kan starte kliniske forsøk på mennesker. Klinisk utprøving av legemidler på mennesker deles inn i ulike faser.

Fase I-studier er første dose til mennesker og prøves ut på en liten gruppe mennesker (50-100). Hensikten er å vurdere legemidlets sikkerhet, toleranse og farmakologi, men gir også den første indikasjon på mulig bredere human anvendelse ved å måle terapeutisk nytteverdi. Hovedfokus i fase I-studier er å oppdage alvorlige bivirkninger eller skader det nye legemiddelet kan gi.

Fase II-studier inkluderer litt flere pasienter (100-200) for å undersøke terapeutisk effekt i større detalj. Man fortsetter også vurdering av sikkerhet, men prøver ut ulike doser for å finne frem til riktig dosering, administrasjonsmåte og varighet av behandling - når den senere skal sammenlignes med andre behandlingsregimer i randomiserte studier.

Fase III-studier er store studier (500-5000 pasienter) der det nye legemidlet skal testes mot gjeldende gullstandard innen behandling. Før nye legemidler aksepteres, kreves dokumentert nytteeffekt i randomiserte studier. Etter én eller flere slike studier vil man ha tilstrekkelig dokumentasjon for å få myndighetsgodkjenning av legemidlet, hvis det nye middelet har fordeler som representerer en nytteverdi for en definert pasientgruppe. Det vil ofte være den pasientgruppen som inngikk i fase III-studien som definerer indikasjon for det nye medikamentet.

Fase IV studier er studier av legemidler som er godkjent hos myndighetene. Her fortsetter man å se på sikkerhet og effekt og kan også inkludere helseøkonomiske studier (14,15).

# Resultat

## Imetelstat

Nedenfor omtales tre studier på lungecancer: én preklinisk, én klinisk fase I/II-studie (pågående) og én fase II-studie (pågående) (16, 17, 18). Én preklinisk studie på prostatacancer og én preklinisk studie på pankreascancer omtales også (19).

## Preklinisk studie – Lungecancer (16)

Hensikten med studien var å undersøke effekten av GRN163L på A549-luciferaseceller (en cellelinje i humant adenokarsinom) in vitro og in vivo på xenograft i mus.

TABELL 1: Resultater fra Dikmen et al. (16):

Studie	In vitro/ in vivo	Celletype	Antall mus (n)	Manipulasjon	Resultat
Lunge Dikmen et al. 2005	In vitro	A549- luciferase -celler		En dose 1µmol/L GRN163L	Redusert telomeraseaktivitet målt ved TRAP <sup>1</sup> assay (sammenlignet med mismatch kontroll)
				Økende dose GRN163L fra 4µmol/L til 250nmol/L	Doseavhengig hemming av telomeraseaktivitet (TRAP assay)
				1µmol/L hver 3.dag i 12 uker	- 20 færre populasjonsdelinger sammenlignet med ubehandlede celler - Telomerlengde redusert fra 5.5kb til 3.5kb (TRF analyse <sup>2</sup> )
				Celler i F12-media tilsatt 1µmol/L GRN163L dag 0 og dag 5 (clonal efficiency assay)	Klarte ikke danne kolonier etter 10 dager behandling (før målt kortere telomerer)
				Celler i soft agar tilsatt 1µmol/L GRN163L før inkubasjon	Sterkt redusert antall dannede kolonier i behandlet gruppe
	In vivo (Xeno- graft i mus)	A549- luciferase -celler	8 mus (4 per gruppe)	Gr1 injisert med ubehandlede celler Gr2 injisert med forbehandlede celler <sup>3</sup> og så 1µmol/L GRN163L hver 3.dag i 3 uker	Gr 1 utviklet metastaser 3-4 uker etter tilført celler Gr 2 utviklet ikke metastaser samme tidsperiode (undersøkt ved disseksjon)
			9 mus (3 per gruppe)	Gr1 injisert med celler Gr2 injisert med celler så 5mg/kg GRN163L hver 3.dag i 3 uker Gr3 injisert med celler så 15mg/kg GRN163L hver 3.dag i 3 uker	Ikke funnet tumor i Gr3 (3 uker etter injeksjon). Tumorer i Gr2 hadde mindre størrelse enn i Gr1 (alle grupper vurdert med LETS <sup>4</sup> ).

<sup>1</sup>telomeric repeat amplification protocol, <sup>2</sup>terminal restriction fragment, <sup>3</sup>1µmol/L GRN163L hver 3.dag i 3 uker, <sup>4</sup>Lysemisjonsstomografi-system

**Korttidsbehandling med GRN163L in vitro:** Telomeraseaktivitet redusert til nesten umålbare nivåer innen 3-4 dager etter tilført én dose 1 µmol/L GRN163L (mismatch kontroll compound hadde ingen effekt). A549-Luc-celler behandlet med ulike doser (4µmol/L til 250 nmol/L) viste doseavhengig hemming av telomeraseaktivitet vurdert ved telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay.

**Forlenget behandling med GRN163L in vitro:** A549-Luc-celler tilført 1 µmol/L GRN163L hver 3. dag i 12 uker viste redusert cellevekstrate etter 3-4 uker. Behandlede celler hadde gjennomgått 20 færre populasjonsdoblinger etter 12 uker sammenlignet med ubehandlede celler og mismatchkontroll. Etter 12 uker var telomerlengde redusert fra 5.5kb til 3.5kb (bestemt ved TRF analyse).

Celler i F12-media gitt to doser 1 µmol/L GRN163L over 10 dager klarte ikke danne kolonier. Effekten ses før målt kortere telomerlengde.

Etter 4-5 ukers behandling dannet celler på soft agar sterkt redusert antall dannede kolonier sammenlignet med ubehandlede celler.

**Antimetastatisk effekt:** Åtte mus ble injisert med ubehandlede cancerceller eller cancerceller forbehandlede med GRN163L hver tredje dag i tre uker (n=4 per gruppe). Behandlingsgruppen fikk

GRL163L hver tredje dag i tre uker. Kontrollgruppen utviklet metastaser 3-4 uker etter tilført cancerceller. Behandlingsgruppen utviklet ikke metastaser. Dissekert etter endt behandling.

Ni mus injisert med cancerceller ble gitt enten ingenting, 5mg/kg GRN163L eller 15mg/kg GRN163L (n=3 per gruppe). Behandlingen ble gitt tre ganger per uke i tre uker. Lav dose ga mindre tumorer enn kontrollgruppen, mens høy dose ikke dannet tumor i løpet av behandling. Funn av tumor ble vurdert med lys emisjon tomografisystem (LETS).

## Preklinisk studie – Prostatacancer (13)

Hensikten med studien til Marian et al. (13) var å undersøke om tumorinitierende celler (TIC) i prostatacancer har telomeraseaktivitet og om disse kan være mål for Imetelstat. Dette undersøkes med in vitro forsøk på 4 ulike cellelinjer fra prostatacancer: DU145, PC3, C4-2 og LNCaP.

TABELL 2: Resultater fra Marian et al. (13):

Studie	In vitro/ in vivo	Celletype	Manipulasjon	Resultat
Prostata Marian et al. 2009	In vitro	DU145 PC3 C4-2 LNCaP	En dose 1µmol/L GRN163L	Redusert telomeraseaktivitet målt ved TRAP <sup>1</sup> assay
			Økende dose GRN163L	Doseavhengig hemming av telomeraseaktivitet (TRAP assay)
			2µmol/L hver 3.dag	Forlenget behandling til telomerer ble kritisk korte førte til stoppet proliferasjon og apoptose
		DU145 CD44 <sup>hi</sup> /integrin α2β1 <sup>hi</sup> DU145 CD133+ LNCaP CD44+/CD24-	En dose 1µmol/L GRN163L	Hemmet telomeraseaktivitet (<20% av ubehandlet kontroll)
		Sidepopulasjonsceller (fra C4-2)	En dose 1µmol/L GRN163L	Hemmet telomeraseaktivitet (<30% av ubehandlet kontroll)
		DU145 LNCaP C4-2	2µmol/L GRL163L i 98 dager 56 dager 145 dager	DU145: redusert andel CD44 <sup>hi</sup> /integrin α2β1 <sup>hi</sup> og CD133+ LNCaP: redusert andel CD44+/CD24- C4-2: redusert andel sidepopulasjon-celler (alle vurdert ved TRF <sup>2</sup> assay)
		DU145	Behandling med GRN163L i ca 100 dager	Dannet ikke lenger holokloner
		DU145 PC3 C4-2 LNCaP	Forlenget behandling med GRN163L	Redusert evne til å danne sfærer

<sup>1</sup>telomeric repeat amplification protocol, <sup>2</sup>terminal restriction fragment

*Inhibisjon med Imetelstat av telomeraseaktivitet i cellelinjer fra prostatacancer førte til telomerforkortning:* Alle fire cellelinjer viste signifikante nivåer av telomeraseaktivitet (TRAP). Imetelstat ga effektiv doseavhengig telomerasehemming. Forlenget behandling (2µM hver 3. dag) ga telomerforkortning i alle cellelinjene (TRF-analyse). Telomerlengde varierte blant de ulike celletypene, og ikke funnet korrelasjon mellom telomerlengde og telomeraseaktivitet. Der hemming av telomerase ble opprettholdt (forlenget behandling) til telomerene nådde kritisk kort lengde, stoppet cellene å proliferere og til slutt døde de. Det ble funnet korrelasjon mellom nødvendig tid før apoptose og initial telomerlengde.

*Tumorinitierende celler (TIC):* Tumorinitierende celler (TIC) innenfor de fire cancercellelinjene ble valgt ut ved hjelp av overflatemarkører forbundet med høyt proliferative, klonogene, tumorigene og metastatiske egenskaper (DU145-celler med CD44+/integrin α<sub>2</sub>β<sub>1</sub><sup>hi</sup>, DU145-celler med CD133+,

LNCaP-celler med CD44+/CD24-). Alle disse celletypene viste telomeraseaktivitet på lik linje med de andre cancercellene, og behandling med Imetelstat førte til hemmet telomeraseaktivitet.

TIC valgt ut vha sidepopulasjon-celler (isolert ved å sortere ut celler som ekskluderte Hoechst 33342 dye). Identifiserte kun en liten gruppe celler i C4-2-cellelinjen. Disse cellene viste også høy telomeraseaktivitet (litt høyere enn de resterende cellene) som ble hemmet av Imetelstat.

Undersøkelser av telomerlengde hos TIC viste samme gjennomsnittlige lengde som resten av cellene de ble isolert fra. Forlenget behandling med Imetelstat viste lik forkortelsesrate av telomerer i TIC og resten av cancercellene.

TIC funnet på grunnlag av evne til å danne holokloner (tettpakke små celler i runde kolonier) ble isolert fra DU145-cellelinjen. Telomeraseaktivitet i disse var litt lavere enn resten av DU145-cellene og telomerlengden var litt kortere.

Andelen TIC (DU145 CD44+/integrin  $\alpha_2\beta_1^{hi}$ ) i den totale cancercellepopulasjonen ble redusert proporsjonalt med lengde av behandling. Først observert etter noe telomerforkortning. Cancercellene var ikke i stand til å danne holokloner etter langvarig Imetelstatbehandling. Evne til selvfornyelse ble undersøkt vha sferoid formation assay, og viste at langvarig behandling reduserte cancercellenes evne til å danne sfærer i alle cellelinjene.

## Preklinisk studie – Pankreascancer (19)

Hensikten med studien til Joseph et al. (19) var å undersøke effekten av Imetelstat på mulige kreftstamceller (CSC) i cancercellelinjer fra pankreas (PANC1) og fra bryst (MDA-MB231 og MCF7). Forsøkene ble utført in vitro og in vivo på xenograft i mus. Siden vi ikke har inkludert brystkreft i denne oppgaven er kun resultatene fra PANC1 omtalt nedenfor.

TABELL 3: Resultater fra Joseph et al. (19):

Studie	In vitro/ in vivo	Celletype	Antall (n)	Manipulasjon	Resultat
Pancreas Joseph et al. 2010	In vitro	PANC1		10 $\mu$ mol/L GRN163L	Redusert telomeraseaktivitet ved GRN163L (93,5% hemming, t test, $P<0,005$ ) målt ved TRAP <sup>1</sup> assay Redusert telomerlengde
				Forsøk1: 10 $\mu$ mol/L GRN163L i 7 uker Forsøk2: 10 $\mu$ mol/L GRN163L i 5 uker	Forsøk1: Redusert andel CD44+/CD24+/ESA+ til 2% (tidl 7%) (ANOVA, $P=0,012$ ) Forsøk2: >2gr reduksjon
				10 $\mu$ mol/L (tre forsøk)	1,1-2,2gr reduksjon i andel ALDH+ celler (tre forsøk)
	In vivo i xenograft i mus	PANC1	30 mus (10 per gruppe)	Gr1 injisert med ubehandlede celler, så saline- injeksjoner Gr2 injisert med forbehandlede celler <sup>2</sup> og så saline- injeksjoner Gr3 injisert med forbehandlede celler <sup>2</sup> , så 30 $\mu$ mol/L GRN163L hver 3.dag i 6,5 uker	Gr1 100% dannet tumor (innen dag 46) Gr2 50% dannet tumor Gr3 40% dannet tumor Signifikant forskjell fra ubehandlet i to forsøk (ANOVA, $P=0,0098$ , ANOVA, $P=0,0011$ )

<sup>1</sup>telomeric repeat amplification protocol, <sup>2</sup>PANC1-celler behandlet med GRN163L in vitro til andel CD44+/CD24+/ESA+ var redusert >3gr sammenlignet med ubehandlet

**Imetelstatbehandling resulterer i telomerasehemming og telomerforkortning:** Imetelstat (10  $\mu$ mol/L) ga 93,5 % reduksjon av telomeraseaktivitet i PANC1 (t test,  $P=0,005$ ) uten særlig effekt på vekstrate. Negativ kontroll hemmet ikke telomerase. Behandlede PANC1-celler hadde kortere telomerlengde.

**Kreftstamceller (CSC):** Celler med overflatemarkører assosiert med kreftstamceller (CD44+/CD24+/ESA+ PANC1-celler) viste noe høyere, men ikke signifikant økt telomeraseaktivitet sammenlignet med ikke-CSC (mens CSC isolert fra cellelinjer fra brystcancer viste lavere aktivitet).

Behandling av PANC1-celler (monolayer) i 7 uker viste reduksjon av CD44+/CD24+/ESA+-celler fra 7,7 % til 2 % av populasjonen (ANOVA, P=0,012). Ved gjentakelse av forsøket ble PANC1-celler behandlet i 5 uker og viste >2 ganger reduksjon. Andelen PANC1-celler med ALDH+ ble også redusert 1,1-2,2 ganger (i tre ulike forsøk).

*Reduserer tumorigeniteten i xenograft i mus:* Totalt 30 mus (n=10 per gruppe) fikk injisert ubehandlede eller forbehandlede PANC1-celler. Forbehandlede cellene var tilsatt Imetelstat in vitro i 45 dager til prosentandelen CD44+/CD24+/ESSA+-celler var redusert >3 ganger sammenlignet med ubehandlet kontroll. Gruppe 1 var implantert med ubehandlet PANC1 og fikk deretter saline in vivo. Gruppe 2 og 3 var implantert med forbehandlede celler og fikk deretter henholdsvis saline og 30 mg/kg Imetelstat tre ganger i uken i 6,5 uker. Prosentandel som utviklet tumor ble observert i 6,5 uker. Tumor engraftment rate på dag 46 var 100 % i gruppe 1, 50 % i gruppe 2 og 40 % i gruppe 3. To forsøk ble utført. Signifikant reduksjon i forhold til ubehandlet gruppe i begge forsøk (studie 1: ANOVA, P=0,0098, studie 2: ANOVA, P=0,0011).

## Pågående kliniske studier – Lungecancer (17, 18)

Omtalt i TABELL 4.

TABELL 4: Pågående kliniske studier Imetelstat (GRN163L):

Studie	Sykdoms-stadium	Antall pasienter	Tidligere behandling	Intervensjon	Mål
Fase I Lunge  *ikke publisert	IIIB (med pleura-effusjon), IV eller residiv	Planlagt: minst 3 per gruppe	Systemisk cancerbehandling inntil 4 uker før	GRN163L 3,2 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	-sikkerhet og maks tolerert dose - farmakokinetikk -effekt: OR <sup>3</sup> , PFS <sup>4</sup> og OS <sup>5</sup>
				GRN163L 4,8 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	
				GRN163L 6 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	
				GRN163L 7,5 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	
				GRN163L 9 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	
				GRN163L 11 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	
				GRN163L 13,5 mg/kg i.v. + paclitaxel + carboplatin	
Fase II Lunge  *ikke publisert	IIIB (med pleura-effusjon), IV eller residiv	Planlagt: 96 totalt, fordelt 2:1	4-6 sykluser med platinumbasert kjemoterapi (siste dose mellom 21 og 42 dager før)	GRN163L 9,4 mg/kg i.v. <sup>1</sup> + standard behandling (Bevacizumab eller observasjon)	-PFS <sup>4</sup> -OR <sup>3</sup> - tid før mortalitet av enhver årsak -sikkerhet og tolerabilitet
				Bevacizumab <sup>2</sup>	

<sup>1</sup>GRN163L gis dag 1 og dag 8 i hver 21-dagers syklus, <sup>2</sup>Bevacizumab gis dag 1 i hver 21-dagers syklus <sup>3</sup>objective response - bedømt ved RECIST-kriteriene,

<sup>4</sup>progresjonsfri overlevelse, <sup>5</sup>generell overlevelse

## Forklaring av tester:

*Telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay:* Lunge: 1x10<sup>5</sup> celler lysert i 40µL NP40 lyse-buffer i 30 min på is. 1µL lysat (2500 celler) ble brukt i hver reaksjon. For vevsprøver ble 50mg vev homogenisert med NP40 lyse-buffer. Prøver ble analysert med reagenser fra TRAPeze-pakken etter produsentens instruksjon (telomeraseektensjon i 30 °C i 30 min, inaktivere telomerase ved 94 °C i 90 sek). Ekstensjonsproduktene ble amplifisert i 28 PCR-sykluser (94 °C i 30 sek, 52 °C i 30sek, 72 °C i 45 sek) sammen med Cy5-merket TS-primer. H1299-lungecancer-cellelinje ble brukt som positiv kontroll, lyse-buffer som negativ kontroll. PCR-prøver (20 µL) ble analysert på 10 % ikke-denaturerende akrylamidgel i 0,5x Trisborate EDTA ved 250V i 2,5 timer. Gelene ble skannet med STORM 860 PhosphorImager skanner system. Aktivitet ble kvantifisert ved å dele intensitet av

ekstensjonsprodukt med intern standard (16). Prostata: celler lysert i CHAPS-buffer. Gel ble visualisert med Typhoon Trio Variable Mode Imager. Kvantifisert med Alphamager 2000 software (13).

*Terminal restriction fragment (TRF) assay:*  $1 \times 10^6$  celler ble resuspendert i quick prep lyse-buffer, tilsatt Triton X-100 (1 %) og proteinase K (2mg/mL), inkubert i 55 °C i 2 timer, så inaktivering av proteinase K i 70 °C i 30 min og dialyse i 10mmol/L Tris-HCl (pH 7,5) og 1mmol/L EDTA (pH 8,0) i 4 °C over natten. Genomisk DNA ble fordøyd av six-restriction enzyme mix, fordøyd DNA separert på 0,7 % agarosegel i 1xTAE buffer. Gelen ble denaturert i 20 min i 0,5 mol/L NaOH, 1,5mol/L NaCl, rensert med destillert H<sub>2</sub>O i 10 min, tørket på Whatman 3MM papir under vakuum i 55 °C i 1 time. Gelen ble nøytralisert i 1,5mol/L NaCl, 0,5mol/L Tris-HCl (pH8) i 15 min, så probet med en radiomerket telomer-probe i 42 °C i 16 timer (i 5xSSC buffer, 5xDenhardts løsning, 10mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mmol/L Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Vasket to ganger med 0,1xSSC i romtemperatur i 15 min. Eksponert for PhosphorImager screen over natten, så analysert med STORM 860 PhosphorImager (16).

## **GV1001**

Nedenfor omtales tre ferdige kliniske studier: én fase I/II- og én fase II-studie på lungecancer, og én fase I/II-studie på pankreascancer (8,20,21). Én stoppet og én pågående fase III-studie omtales også (22,23).

### **Felles for alle studiene:**

*Primærprotokoll:* Intradermal injeksjon i høyre para-umbilicalområde 5-15 min etter 30µg adjuvant GM-CSF i.d. i samme område. Dose angis i TABELL 5. Tre injeksjoner første uke, så én injeksjon uke 2, 3, 4, 6 og 10. Kun pasienter som mottar 6 vaksinasjoner første 4 uker anses evaluerbare for vurdering av immunrespons. Alle som mottar minst én vaksine vurderes for sikkerhet (8,20-23).

Undersøkelse av bivirkninger, blodprøver, fysisk undersøkelse og Karnofsky Performance Status(pankreas)/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)-status (lunge) ble gjennomført ved hvert møte (8,20-23).

*Måling av immunrespons:* Immunrespons ble målt ved hjelp av DTH-test (delayed type hypersensitivity) og funn av GV1001-spesifikke T-celler i perifert blod (8,20-21)

*DTH-hudtest:* Gjennomført før vaksinasjon og alle møter fra og med uke to. 60nmol (112µg) GV1001 i 0,10ml saline injisert i.d. i venstre para-umbilicalområde. ≥5mm diameter erytem/hevelse 48timer etter administrasjon ble tolket som positiv test. Pasientene målte og rapporterte selv (8).

*In vitro T-cellerespons:* Undersøkelser av GV1001-spesifikke T-celler i perifert blod ble gjort før vaksinasjon, uke 6 og uke 10. Perifert blod-mononukleære celler (PBMC) ble isolert fra perifert blod og frosset. Prøver fra før og etter vaksinasjon ble prosessert parallelt. Spesifikke T-celler ble ekspandert ved at tinte PBMC i kultur ble tilsatt enten GV1001 eller kontrollpeptider i to sykluser før assay. Dag 14-18 ble kulturcellene testet for spesifikk prolifererende kapasitet mot GV1001 og kontrollpeptider i 25µm konsentrasjon, ved å bruke T-celler og autologe, bestrålte PBMC som antigenpresenterende celler. <sup>3</sup>H-thymidine ble tilsatt før telling. Stimulatorisk indeks (SI) (counts per minute med GV1001 dividert med c.p.m. uten GV1001) ≥2 ble tolket som positiv T-cellerespons (8).

TABELL 5: Kliniske studier GV1001:

Studie	Sykdoms- stadium	Antall evaluerte (inkluderte) pasienter	Tidligere behandling	Intervensjon	Eval- ert/ Inkludert	Imm.- respons	Imm. respons sammenlagt	MO <sup>1</sup> / PFS <sup>2</sup> ikke- respon- denter	MO <sup>1</sup> / PFS <sup>2</sup> responde nter
Fase I/II  Lunge  Brunsvig et al. 2005	NSCLC IIB-IV (21 pas med IV)	24 (26)  (14 fullførte protokoll)	Kjemo (inntil 4 uker før)/ stråling (inntil 6 uker før)/ ubeh	Lavdose: GV1001 60nmol i.d. + HR2822 60nmol i.d.	12 (12)	7/12	46 % (11/24)  Etter booster: 54% (13/24)	MO: 3,5 mnd	MO: 19 mnd  P<0,001
				Høydose: GV1001 300 nmo i.d.1 + HR2822 60nmol i.d.	12 (14)	4/12	85% (12/14) fullført protokoll		Etter 9 år: Én pas komplett resp Én pas ingen sykdoms- tegn
Fase II  Lunge  Brunsvig et al. 2011	NSCLC IIIA/B	20 (23)	Docetaxel og stråling innenfor 4 uker før	GV1001 300 nmol i.d.			80% (16/20)	PFS: 182 dager	PFS: 371 dager P=0,20
Fase I/II  Pancreas  Bernhardt et al. 2006	Ikke- resektabel pancreas- cancer	38/48	ubehandlet	Lavdose: GV1001 60nmol i.d.	8(11)		63%	MO: 2,9 mnd	MO: 7,2 mnd  P=0,001
				Intermediær-dose: GV1001 300nmol i.d.	16(17)	12/16			
				Høydose: GV1001 1,0µmol i.d.	14(20)				
Fase III  Pancreas  Buanes et al. 2009  PrimoVax *stoppet	Ikke- resektabel pancreas- cancer	365 (planlagt 520)	Kjemoterapi- naive	Arm A: Gemcitabine 1,000 mg/m <sup>2</sup> 30 min i.v.	182			MO: 7,3 mnd PFS: 3,7 mnd	
				Arm B: GV1001 300nmol s.c. Ved progresjon: GV1001 + Gemcitabine	183			MO: 5,9 mnd PFS: 1,9 mnd	
Fase III  Pancreas  TeloVac *pågår	Ikke- resektabel pancreas- cancer	Planlagt 1110		Arm 1: Gemcitabine i.v. (30 min) dag 1, 8 og 15 og oral capecitabine x2 per dag , dag 1-21 (gjentas hver 4.uke)				Ønsket mål: -ettårsoverlevelse -PFS -livskvalitet <sup>4</sup> -klinisk respons -objektiv respons (RECIST-kriterier) -toksisitet - overlevelse og respons vurdert med DTH-test	
				Arm 2: først 1-2 runder Gemcitabine + Capecitabine så GV1001 <sup>3</sup> Ved progresjon: avslutte GV1001, så Gemcitabine + Capecitabine					
				Arm 3: gemcitabine + capecitabine + GV1001					

<sup>1</sup>Median overlevelse, <sup>2</sup>Progresjonsfri overlevelse, <sup>3</sup> gitt dag 1, 3, 5 i uke 9, en gang per uke i uke 10, 11, 12 og 14, så en gang per måned, <sup>4</sup> vurdert med European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)-Quality of Life (QLQ) C30 questionnaire og the European Study group for Pancreatic Cancer-QLQ questionnaire

## Doseeskalerende fase I/II-studie – Ikke-resektabel pankreascancer (8)

Hensikten med studien til Bernhardt et al. (8) var å undersøke sikkerhet og toleranse ved administrasjon av GV1001, finne optimal dose for immunologisk respons og registrere overlevelse.

**Inklusjonskriterier:** 18-75 år. Ikke-resektabel, histologisk bekreftet adenokarsinom i pankreas, ikke tidligere behandlet. Karnofsky performance status >70 %, adekvat funksjon av beinmarg, lever, hjerte og nyre.

**Primærprotokoll:** Tre dosegrupper: lavdose 60nmol (112µg), intermediærdose 300nmol (560µg) og høydose 1.0µmol (1,87mg).

**Oppfølging:** 18 evaluerbare etter primærprotokoll. Månedlig boostervaksine i opptil ett år. Dose som i primærprotokoll.

**Sikkerhet:** Totalt 424 vaksinedoser (1-21 per pasient) og 354 DTH injeksjoner. Ikke observert toksisitet eller alvorlige bivirkninger relatert til behandling. Alle pasienter opplevde rødme eller hevelse rundt stikksted, og enkelte merket feber (2 %), frysninger (10 %), smerte (6 %), trøtthet (2 %), kvalme (12 %) og oppkast (2 %).

**Immunrespons:** Høyest andel respondenter i intermediærdosegruppen (75 % av evaluerbare), men ikke signifikant forskjell mellom grupper. Lavdosegruppen viste kun respons med DTH, ikke in vitro T-cellerespons. Totalt viste 63 % av de evaluerbare pasientene immunrespons (inkludert to med positiv test før behandling).

Tre CD4<sup>+</sup> Th-cellekloner fra to ulike pasienter gjenkjente autologe APC eksponert for rekombinant hTERT.

Mononukleær cellesuspensjon (inneholdende tumorceller, tappet for T-celler) fra en pasients ascitesvæske stimulerte autologe GV1001-spesifikke Th-cellekloner i lik grad som autologe APC pulsert med GV1001.

**Overlevelse:** Median overlevelse for lav-, intermediær- og høydose var henholdsvis 4,0, 8,6 og 5,1 måneder. Signifikant økt overlevelse i intermediærdose-gruppen (log rank test, intermediær VS lav: P=0,006, intermediær VS høy: P=0,05). Median overlevelse hos immunrespondenter var 7,2 mnd og 2,9 mnd hos ikke-responsdenter (log rank test, P=0,001).

## Doseeskalerende fase I/II-studie – Ikke-småcellet lungecancer (NSCLC) (20)

Hensikten med studien til Brunsvig et al. (20) var å undersøke sikkerhet, tolerabilitet og karakterisere en eventuell immunologisk respons av kombinasjonsvaksine med GV1001 og HR2822 på pasienter med ikke-småcellet lungecancer (NSCLC). Sekundært mål var å observere mulig tumorrespons. HR2822 er identisk med I540.

**Inklusjonskriterier:** 18-75 år. Histologisk bekreftet NSCLC. Tidligere ubehandlet eller immunsuppressiv behandling inntil 4 uker før vaksine. Performance status ECOG 0-2. Adekvat funksjon av beinmarg, lever, hjerte og nyre. Pasienter med hjernemetastaser ble ekskludert.

Kun 14 pasienter mottok alle 8 vaksinasjonene etter protokoll (9 i lavdose og 5 i høydose). De fleste hadde stadium IIIB eller IV (én pasient i hver av stadiene IIIB og IIIA). 7 pasienter ble trukket fra studien på grunn av hjernemetastaser.

**Protokoll:** To dosegrupper: lavdose 60nmol GV1001 og høydose 300nmol GV1001, begge i kombinasjon med 60nmol HR2822.

**Oppfølging:** 4 pasienter med immunrespons og/eller stabil sykdom etter primærprotokoll. Kun høydose (300nmol) gitt som booster, hver 3./6. mnd.

**Sikkerhet:** Beinmargsprøver ble tatt før vaksine og 3-6 måneder etter behandling (flere ganger når gitt boostervaksiner). Totalt gitt 214 vaksinedoser. Ingen alvorlige bivirkninger observert relatert til



behandling. Noen rapporterte milde episoder med feber og frysninger (tre hendelser ved lavdose og syv ved høydose).

Beinmargsprøver fra pasienter med immunrespons ble testet for endring i klonogenisitet. Colony-forming unit cells (CFU-C) (inkubert 14 dager) og Long-term culture-initiating cells (LTC-IC) (inkubert 14 dager etter 5 uker kultur) ble testet med standardisert clonogenic assay. Ingen signifikante endringer i prøver tatt før og under vaksinasjon (inkludert oppfølging av boostervaksiner).

**Immunrespons:** 11 av de 24 evaluerbare (46 %) viste immunrespons mot GV1001 og 2 (8 %) mot HR2822 (7 fra lavdosegruppen, 4 fra høydosegruppen). To ikke-responder etter primærprotokoll ble responder etter boostervaksine. 54 % responsrate (13 pas) når inkludert booster. 85 % responsrate (12/14) blant de som fullførte primærprotokoll. Respons målt ved DTH-test kom 3-9 uker etter startet behandling.

GV1001-spesifikke T-cellekloner fra to pasienter med immunrespons viste størst proliferasjon etter møte med APC og GV1001, men proliferte også ved APC og rekombinant hTERT (ingen proliferasjon etter møte med APC uten peptid).

**Overlevelse:** CT/MR uke 12 viste 18 pasienter (72 %) med progressiv sykdom, syv (28 %) med stabil sykdom (én ikke evaluert pga infeksjon). Median overlevelse 8,5 mnd (alle 26 pasienter). Ved 12 og 18 mnd var henholdsvis åtte og seks pasienter i live.

Én pasient med immunrespons etter første boostervaksine viste komplett respons. Før inklusjon i studien var pasienten diagnostisert med stadium IIIB adenokarsinom. Fem runder kjemoterapi (siste infusjon 9 uker før) og stråleterapi (inntil 2,5 uker før) ble gitt før vaksinasjon. Ved inklusjon hadde pasienten stadium IIIA. Etter boostervaksiner kunne man ikke finne tumor ved CT.

## Fase II-studie og oppdatering av fase I/II-studie – NSCLC (21)

Det primære målet med studien til Brunsvig et al. (21) var å evaluere immunologisk respons når GV1001 kombineres med kemo-/strålingsterapi. Sekundære mål var videre undersøkelse av sikkerhet og estimat av immunresponsrate og tid før sykdomsprogresjon. I tillegg ble det utført oppfølging av noen av pasientene fra studien over.

**Inklusjonskriterier:** ≥18 år. Inoperabel stadium IIIA/B NSCLC, behandlet med ukentlig docetaxel 20mg/m<sup>2</sup> og 3D radioterapi 2 Gy x 3 innenfor de siste fire ukene før vaksinasjon (daværende standard behandling). ECOG Performance Status 0-2. Adekvat funksjon av beinmarg, lever, hjerte og nyre. Pasienter med metastaser ble ekskludert.

20 evaluerbare pasienter (23 inkluderte). To pasienter ekskludert pga to injeksjoner hver uten GM-CSF, og én pasient pga lungeabscess og progresjon.

**Protokoll:** Én dosegruppe: 300nmol GV1001.

**Oppfølging:** 15 immunresponder etter primærprotokoll. Boostervaksine gitt uke 14, 18, 22, måned 6 og måned 9.

**Sikkerhet:** Totalt antall doser var 323. Syv tilfeller med negative hendelser (hos 6 pasienter) ble observert, men alle vurdert relatert til underliggende sykdom og ikke til behandlingen.

**Immunrespons:** Immunologisk responsrate 70 % (16/23) ved intention to treat-analyse og 80 % (16/20) per protokoll.

**Oppfølging:** Varig GV1001-spesifikk T-cellerespons i 13/15 (maks oppfølgingsperiode 91 uker).

**Progresjonsfri overlevelse (PFS):** Median PFS var 357 dager. Økt PFS hos immunresponder VS ikke-responder, median 371 VS 182 dager (Kaplan-Meier/log-rank analysis, P=0,20). Cox-

regresjonsanalyse antydde at assosiasjon mellom positiv immunrespons og forlenget PFS forble uendret etter korreksjon for andre variabler, f.eks. sykdomsstadium (HR 1,9, P=0,21). Når artikkelen ble skrevet var tumorprogresjon observert hos 17/23 pasienter (intention to treat). Fem av seks pasienter uten tegn til residiv var immunresponder.

#### **Oppfølging av tidligere fase I/II studie:**

Oppfølging av studien til Brunsvig et al (20).

**Økt overlevelse hos immunresponder:** Økt overlevelse hos immunresponder VS ikke-responder (P<0,001; log-rank test), median overlevelse henholdsvis 19 mnd og 3,5 mnd. Innenfor pasientgruppen med sykdomsstadium IV (19 pasienter) og innenfor de som fullførte primærprotokoll (17 pasienter) viste responder signifikant økt overlevelse (P<0,005; log-rank test). Cox-regresjonsanalyse etter korreksjon for sykdomsstadium viste at immunrespons var en uavhengig prognostisk faktor (HR 11, P=0,001).

Tidligere omtalte pasient med komplett respons etter boostervaksiner hadde fortsatt ikke tegn til residiv da oppfølgingsstudien ble skrevet 9 år senere. En annen pasient med sykdomsstadium IIIB ved studiestart har mottatt 43 vaksiner og har ingen tegn til sykdom etter 93 måneder. En tredje pasient hadde sykdomsstadium IV med bilaterale lungemetastaser ved studiestart, men opplevde stabilisering av sykdommen etter vaksinasjoner og levde i 6 år etter.

### **PrimoVax – Fase III-studie – Inoperabel pankreascancer (22)**

Studien til Buanes et al. (22) var den første fase III-studien med GV1001, og skulle undersøke effekt på overlevelse av GV1001 i sekvensiell kombinasjon med Gemcitabine sammenlignet med Gemcitabine monoterapi. Studien ble stoppet da GV1001-behandling ikke viste økt overlevelse.

**Inklusjonskriterier:** Langtkommen pankreascancer. Ikke tidligere kjemoterapi. ECOG Performance Status 0-1.

**Protokoll:** Pasienter ble randomisert 1:1. Arm A: Gemcitabine (1,000 mg/m<sup>2</sup> 30 min i.v.) ukentlig i 7 uker, så 1 uke uten og 3 uker med i 4 ukers sykluser. Arm B: GV1001 0,56 mg s.c. + GM-CSF dag 1, 3, 5, 8, 15, 22, 36, så hver fjerde uke. Ved sykdomsprogresjon ble Gemcitabine tilført behandling.

**Sikkerhet:** Bivirkninger (grad 3-4) A/B: gastrointestinale 6 %/8 %, infeksjon 5 %/5 %, vaskulære sykdommer 2 %/3 %, nøyтроpeni 6 %/3 %.

**Resultat:** studien ble stoppet ved 365 (A/B:182/183) inkluderte pasienter (520 planlagte). Dødsfall: 114/124. Median overlevelse: 7,3/5,9 mnd (HR 0,8; 95 % CI 0,6-1,0). Median PFS: 3,7/1,9 mnd (HR 0,5; 95 % CI 0,4-0,7). Gruppene var godt balansert for alder, kjønn, ECOG PS og sykdomsutbredelse.

### **TeloVac – Fase III-studie – Inoperabel pankreascancer (23)**

Det primære målet med denne pågående studien er å undersøke 1-års overlevelse ved GV1001-behandling i samtidig eller sekvensiell kombinasjon med kjemoterapi sammenlignet med kjemoterapi alene. Sekundære mål er PFS, livskvalitet, klinisk respons, objektiv respons (RECIST-kriterier), toksisitet, overlevelse og respons vurdert med DTH.

**Inklusjonskriterier:** ≥18 år. Histologisk eller cytologisk bekreftet duktalt adenokarsinom eller uddifferensiert karsinom i pankreas. Lokalt langtkommen eller metastaser (inoperabel). Ikke tidligere kjemoterapi. Ikke stråleterapi siste 4 uker. Ikke intracerebrale metastaser eller meningeal karsinomatose. ECOG PS 0-2. Forventet levetid >3 mnd. Adekvat funksjon av beinmarg, lever, nyre og hjerte.

**Protokoll:** Planlagt inklusjon av 1100 pasienter. Arm I: gemcitabine hydrochloride IV over 30 minutter dag 1, 8, og 15 og oral capecitabine to ganger daglig dag 1-21. Gjentas hver 4.uke dersom ikke sykdomsprogresjon eller uakseptabel toksisitet. Arm II: Først gemcitabine hydrochloride + capecitabine som i arm I, opptil 2 runder. Så sargramostim (GM-CSF) i.d. + GV1001 i.d. dag 1, 3 og 5 i uke 9, en gang ukentlig uke 10-12 og 14, så en gang månedlig. Dersom sykdomsprogresjon stoppes vaksinerterapi og gemcitabine + capecitabine gjenstartes. Arm III: Gemcitabine hydrochloride + capecitabine som i arm I. I tillegg GM-CSF i.d. + GV1001 i.d. dag 1, 3 og 5 uke 1, én gang ukentlig uke 2, 3, 4 og 6, så én gang månedlig.

## Diskusjon

---

Interessen for telomerase skjøt fart da Nobelprisen i fysiologi og medisin i 2009 ble tildelt Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider og Jack W. Szostak for deres oppdagelse av telomerase for 25 år siden (4). Selv om det nå er mye forskning som pågår, er det viktig å poengtere at mye av den telomeraseorienterte forskningen fortsatt er i begynnerfasen. Studiene vi har tatt for oss i denne prosjektoppgaven er de som er kommet lengst i klinisk utprøving. Disse har vist effekt på flere typer cancer, bl.a. prostata, pankreas og lunge som vi skriver om, samt andre typer som melanom, ulike typer blodkreft, glioblastom, brystkreft, lever med mer (7,9). Som nevnt er dette tidlig forskning, og av denne grunn er de fleste studiene på området gjort in vitro, eller in vivo på dyr. GV1001-orientert behandling har kommet lengst i utviklingsfasen, og her tar vi for oss de viktigste kliniske studiene.

### GV1001

Kliniske studier utført av Brunsvig et al. (20,21) og Bernhardt et al. (8) viser immunrespons ved GV1001 behandling, samt at denne behandlingen er trygg. Studiene viser også økt overlevelse blant immunresponderter.

I Brunsvig et al. (20) ble pasientene ikke screenet for lungemetastaser ved inklusjon. Dette medførte stort frafall i høydosegruppen da 7 pasienter ble ekskludert grunnet metastaser. Noen av disse hadde allerede fått 6 eller flere injeksjoner (derfor evaluerbare), uten at immunrespons ble testet. 5 av 12 i høydosegruppen tolkes derfor automatisk som ikke-responderter uten at de ble testet. Det samme gjelder 2 av 12 i lavdosegruppen. Gjennomsnittlig levealder for NSCLC stadium IIIB og IV var under 12 mnd da denne studien ble utført (20). Median overlevelse hos immunresponderter var 19 mnd, 3,5 mnd hos ikke-responderter. Selv om det er signifikant forskjell ( $P < 0,005$ ) er overlevelsen slående lav i ikke-respondertergruppa, og det vil ikke være representativt.

I oppfølgingsstudien (21) er det to pasienter (pasient nr. 710 og 727) som fortsatt lever etter 9 år. De får fortsatt boostervaksiner hver 6. og 3. mnd. Pasient nr. 712 hadde bilaterale lungemetastaser ved vaksinasjonsstart. Metastasene gikk tilbake, pasienten opplevde stabilisering av sykdommen, og levde 6 år. Disse langtidsoverlevende er interessante. Immunresponsen hos de to som lever kom først etter boostervaksinasjon. Er det gunstig med sen respons på vaksinasjon? Dette kan det være interessant å forske på videre.

I Brunsvig et al. (21) viser de at hele 5/6 av pasienter uten tegn til residiv er immunresponder. Median overlevelse var 371 dager for immunresponder VS 182 dager for ikke-responder, men forskjellen var ikke signifikant ( $P=0,20$ ).

Et av hovedmålene med studiene har vært å vise at GV1001 gir en immunrespons. Det vi vet er at pasientene utviklet T-celler spesifikke for GV1001, men ingen av studiene har testet om disse T-cellene faktisk reagerer med pasientens tumorceller direkte. Den ene studien derimot viste at T-cellene ble aktivert av ascites fra en pasient med pankreascancer (8). Det er plausibelt at det var pasientens egne kreftceller T-cellene reagerte på, men vi kan ikke se helt bort fra at det kan ha vært antigenpresenterende celler (som tidligere har vært eksponert for GV1001) i ascitesvæsken som T-cellene reagerte på. Selv om det ikke er gjort direkte forsøk rettet mot tumorceller, så vil eventuell økt overlevelse vise effekt på disse.

Gjennomsnittlig levealder for en med metastatisk pankreaskreft er med vanlig behandling ca 6 mnd. I fase I/II studien utført av Bernhardt et al. (8) var median overlevelse 7,2 mnd hos responder, og 2,9 mnd hos ikke-responder. Derimot var median overlevelse 8,6 mnd i intermediærdosegruppen, som ble vist i denne studien å være den mest optimale dosen. Pasienten i høydose- og lavdosegruppen ser ut til å ha lavere Karnofsky performance status. Dette vil kunne gi en falskt høy overlevelse i intermediærdosegruppen. I tillegg er dette et studiedesign laget for å si noe om sikkerhet, samt optimal dose ved behandling, og av den grunn kan man ikke trekke for sikre konklusjoner med henhold på overlevelse per se.

Samtlige GV1001-studier har også for få pasienter til å utelukke at effekten man ser på overlevelse er tilfeldig. Bedre konklusjoner vil man se etter RCTer (se under fase III-studier). Ytterligere tilkommer det faktum at pasientene er tidligere behandlet. Man vet derfor ikke sikkert om effekten kommer av GV1001 eller kjemo-/stråleterapi. Her kan vi nevne pasienten fra studien utført av Brunsvig et al. med komplett respons (20). Denne pasienten hadde tidligere vært gjennom kjemo- og stråleterapi, hvoretter han hadde blitt nedklassifisert fra IIIB til IIIA før inklusjon i studien.

I tillegg har enkelte påpekt at immunresponder muligens har økt overlevelse kun fordi disse har bedre helse i utgangspunktet og akkurat derfor har økt sannsynlighet for å få en immunrespons (11). Et motargument er at studiene har forsøkt å motvirke dette vha inklusjonskriterier som måler generell allmenntilstand (f.eks. Karnofsky status, hjerte-, lunge-, nyrefunksjon).

Felles for alle studiene er at de inkluderte pasientene har dårlig prognose i utgangspunktet. Svært få pasienter fullfører primærprotokollen. Én pasient døde så tidlig som 3 dager etter iverksatt behandling (8). En del pasienter dør altså så fort at vaksinen ikke rekker å ha effekt. Det kan derfor tenkes at man ville sett en større effekt på overlevelse dersom man hadde kommet tidligere til med behandlingen. Dette ser vi også ved at immunrespons hos de som fullfører er mye høyere; i Brunsvig et al. 12/14; 85 % (20).

## Imetelstat

In vitro-studier utført av Dikmen et al. (16), Marian et al. (13), Joseph et al. (19) viser at Imetelstat hemmer telomeraseaktivitet og forkorter telomerer.

Undersøkelser av Imetelstats påvirkning av tumorvekst i xenograft i mus ble utført ved å starte behandling samtidig som cancerceller ble injisert (16,19). Dette skiller seg fra kliniske forhold hos mennesker der behandling starter etter etablert tumor. Forsøk ble også gjort med forbehandlede celler, hvilket kun kan sammenlignes med forebyggende behandling (16,19).

Lunge- og pankreasstudien ble gjort med én type celler (henholdsvis A549 luc- og PANC1 celler), prostatastudien på fire typer celler (DU145, PC3, C4-2, LNCaP) (13,16,19). Dette gjelder både in vitro og i xenograft. Dette lar seg ikke nødvendigvis overføre til mennesker.

Undersøkelse av behandlingseffekt på cancerceller i prostata og pankreas (13,19) viste redusert andel TIC vurdert ved overflatemarkører, evne til å danne holokloner, sfærer, samt sidepopulasjon. Studien viser at TIC har høy telomeraseaktivitet, og dette motbeviser derfor teorien om at TIC er såkalte "quiescent cells"; celler med antatt lav telomeraseaktivitet pga få celledelinger. Det er likevel mulig at telomerase har en annen funksjon hos disse cellene (mer omtalt senere) (13).

Totalt sett har studiene gjort på Imetelstat vist lovende effekter så langt. Riktignok er det først nå at de har kommet i klinisk utprøving, og det gjenstår å se om det er like gode resultater hos mennesker. De studiene som er gjort på dyr viste at Imetelstat var trygt (13,16,19), og at det førte til redusert tumorvekst og færre metastaser (16). Riktignok er forsøkene utført på få dyr,  $n \leq 30$  i alle studiene. Den fremragende effekten på xenograft i mus trenger ikke nødvendigvis å la seg overføre til mennesker. Man vet fremdeles heller ikke hvordan biodistribusjonen til Imetelstat vil være hos mennesker.

## **Bivirkninger**

Felles for samtlige studier vi har tatt for oss er at telomaserettede behandlingsstrategier har vist lite bivirkninger og er ansett som en veldig trygg behandlingsform mot kreft (8,9,13,16,19,20,21). I pågående kliniske studier med Imetelstat har medikamentet så langt blitt tolerert bra (9). For GV1001 har det ikke blitt registrert alvorlige bivirkninger. Det man så var lettere gastrointestinale plager som kvalme, oppkast etc., samt forkjølelssymptomer med feber, smerte, trøtthet og frysninger. I tillegg erytem og hevelse ved innstikksområdet (8). Enkelte av disse symptomene kan indikere immunrespons, og derfor kan de ses på som positive reaksjoner (20). Det har heller ikke vært registrert benmargstoksitet ved langtidsoppfølging (21).

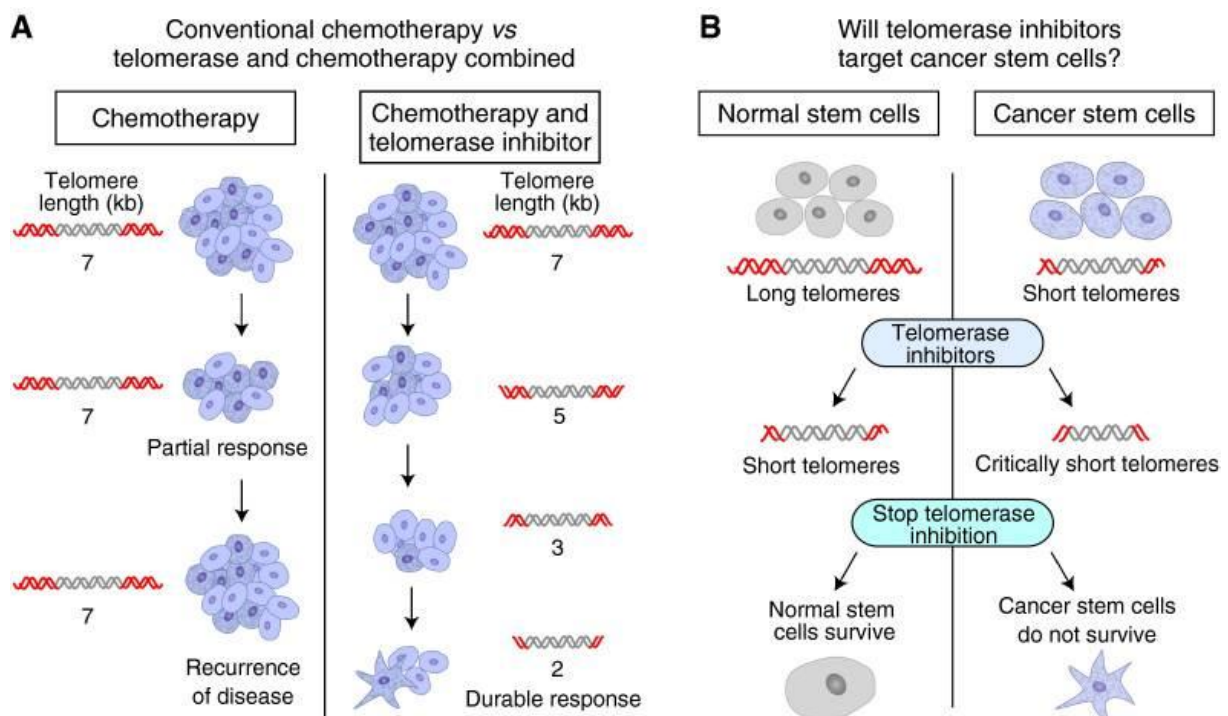
Hvordan kan man forklare at telomaserettet behandling har få bivirkninger? Er det ikke plausibelt at telomaserettet behandling også vil affisere kroppens stamceller?

Studier har vist at somatiske stamceller har lengre telomerer enn TIC (7). Dette gir behandlingen et terapeutisk vindu hvor telomaserettet behandling kan forhindre deling av kreftceller, samtidig som somatiske stamceller vil forbli relativt uaffisert (se figur 4B). Trolig er dette mye av årsaken til den lave benmargstoksitet man har sett ved langtidsoppfølging (21). En annen forklaring på at behandlingen gir lite bivirkninger kan være at enkelte somatiske celler (bl.a. fibroblaster) har noe som kalles alternativ telomerforlengelse (se senere), og derfor er uaffisert av telomaserettet behandling (4).

## Synergi

En hypotese som har blitt lagt frem er at telomeraserettet behandling kan gi en synergistisk effekt i kombinasjon med vanlig behandling (cellegift, strålebehandling). Tanken er at cellegift alene som oftest ikke er i stand til å sørge for en varig effekt (fare for residiv og metastaser), men at i kombinasjon med telomeraserettet behandling vil kunne føre til en varig respons (7,9,12,13,21). GV1001 har vist seg å gi en ytterligere effekt når behandlingen følger etter kjemo-/strålingsterapi (21). De skadede cellene etter kjemo-/strålingsterapi kan medføre en forsterket immunologisk effekt (21). Synergistisk effekt ses også ved Imetelstatbehandling. Der kjemoterapi kun tar bulk cells har Imetelstat blitt vist å redusere andelen TIC, og dermed vil kombinasjonen muligens gi en varig effekt (13,19) (se figur 4A).

**Figur 4:** Telomerasehemmere bør antageligvis kombineres med annen kreftbehandling:



Figuren viser flere hvorfor kjemoterapi og telomerasehemmere kan føre til en varig respons når de kombineres (A). Den viser også at somatiske stamceller kan overleve mens kreftcellene dør pga forskjellen i telomerlengde, og at dette gir et terapeutisk vindu (B).

Studiene av GV1001 viser også at det tar tid før pasientene får påvist en immunrespons. Brunsvig et al. viste at immunresponsen målt ved DTH kom først etter 3-9 uker (20). Derfor kan det være nødvendig å kombinere det med kjemoterapi som virker raskt.

## Lag-time og alternativ telomerforlengelse (ALT)

Lag-time er et fenomen som viser til at det tar tid fra medisinen (Imetelstat) virker, før cellene påvirkes. Dette kan forklares ved at telomerene ikke umiddelbart blir korte, men det tar en god del celledelinger før cellene får korte nok telomerer til at de når "senecence"-stadiet (9,13). Allikevel har det overraskende nok vist seg at kreftcellene responderer raskere enn forventet. Det har vist seg at



det kan være en ikke-telomeravhengig virkning av telomerasehemmere (9,19). Før man kan si noe sikkert om dette er det behov for videre forskning på området.

ALT står for "alternative lengthening of telomeres", noe som på norsk vil si alternativ forlengelse av telomerene. Noen celler, fibroblaster og sarkomer, har ALT, altså andre måter å forlenge telomerene på (vha rekombinasjon av telomerene) (4). Dette kan være en mulig resistensmekanisme mot telomeraserettet kreftbehandling. Det er mulighet for at forlenget behandling med telomerasehemmere kan komme til å medføre at kreftcellene skifter over til ALT (4). I så fall vil Imetelstat kunne miste effekten etter en viss tids behandling.

### Fase III-studier

Den eneste fase III-studien som har blitt avsluttet er PrimoVax-studien (22). Denne ble avsluttet pga at man ikke så noen bedret overlevelse hos pasientene som fikk GV1001-vaksinasjon. Det har vært flere som har forsøkt seg på å forklare de skuffende resultatene. Yucheng Xu et al. (4) har to mulige forklaringer: 1) kreftpasienter er relativt immunsupprimerte fra før av, og det vil derfor være vanskelig å få immunforsvaret til å generere sterk nok immunrespons til at man ser klinisk effekt, 2) kreftcellene har relativt få hTERT-molekyler per celle (ca 100), hvilket kanskje ikke er tilstrekkelig for at immunforsvaret skal oppdage dem og generere en respons. PrimoVax-studien sammenlignet ordinær Gemcitabinebehandling med GV1001-vaksinasjon frem til progresjon, hvor de deretter fikk Gemcitabine i tillegg. Publisert informasjon om studien oppgir ikke hvor mange i GV1001-gruppen som utviklet immunrespons. Ut ifra tidligere studier på pankreascancer kan man anta responsrate på 75 % (8). Gitt disse forutsetningene har 25 % av pasienten ikke fått effektiv behandling før progresjon av sykdommen. Dette kan virke negativt inn på resultatene i GV1001-gruppen. Det ville ha vært interessant å se overlevelse hos immunrespondenter alene. Tidligere studier satt vaksinen intradermalt, men i PrimoVax ble de satt subkutan (8,22). Studieoppsettet er også uheldig med tanke på at en eventuell synergistisk effekt ikke kommer til uttrykk.

TeloVac-studien derimot, som er den eneste fase III-studien som pågår mens denne oppgaven skrives, vil kunne dra nytte av denne eventuelle synergistiske effekten (23). Det blir derfor spennende å se i fremtiden, hvorvidt TeloVac-studien er mer lovende enn det PrimoVax-studien var.

### Praktisk anvendelighet

Det er flere ting som må vurderes med tanke på om behandlingen vil være brukbar. Behandlingen kan ikke medføre for stor belastning for pasientene. Dette er en pasientgruppe som har forholdsvis dårlig prognose, og man vil derfor unødig medføre ytterligere plager/komplikasjoner i den korte tiden de har igjen. Sammenlignet med kjemoterapi har GV1001 (og Imetelstat hos dyr) vist seg å ha få bivirkninger og tolereres bra. Vaksinasjonsprogrammet virker gjennomførbart med tanke på hyppigheten av injeksjoner.

Administrasjonsmåten er lett gjennomførbar. Det kan tenkes at injeksjonene kan foretas hos fastlegen, i motsetning til kjemo-/stråleterapi som må gjennomføres på sykehus. Dette kan spare pasientene for belastende reiser i den siste tiden. I tillegg har pasientene ofte allerede et godt forhold til en fastlege som har fulgt dem lenge. Da vil de muligens føle seg bedre ivaretatt.

Et annet essensielt spørsmål er kostnad. Hvor dyre vil medikamentene bli? Erfaringsmessig vil de farmasøytiske firmaene ta seg godt betalt, og i den perioden de har patent vil nok medikamentene være forholdsvis dyre. Kostnadene kan allikevel reduseres vha en mulig billigere administrasjonsmåte.

## Konklusjon

Behandling med GV1001 og Imetelstat har så langt vist seg å være trygt. Forventningene til behandlingene som en universell kur for kreft kan allikevel ikke påstås å være innfridd. Vi vil allikevel hevde at telomeraserettet behandling kan være et viktig supplement til dagens kreftbehandling. Den synergistiske effekten i kombinasjon med kjemo-/stråleterapi har fremdeles ikke vært utprøvd godt nok, og vi tror kombinasjonsbehandling kan gi en bedre og varig effekt.

Ettersom vi har sett utelukkende på tre typer cancer er det mulig vi har oversett annen viktig forskning gjort på området. Det understrekes derfor at generaliserbarheten i vår konklusjon kan være noe begrenset.

Det er fortsatt mye forskning som gjenstår på området. Oppgaven vår har også åpnet for nye spørsmål, f.eks. alternative cellebiologiske funksjoner av telomeraseenzymet, ALT-mekanismer og synergispørsmålet. I skrivende stund pågår flere kliniske studier som det derfor vil være svært interessant å se resultatene av i fremtiden.

## Referanseliste

---

1. Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *British Journal of Pharmacology*. 2007;152:1003-1011.
2. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):9-18.
3. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett*. 2010 Sept 10;584(17):3819-3825.
4. Xu Y, He K, Goldkorn A. Telomerase Targeted Therapy in Cancer and Cancer Stem Cells. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2011 June;9(6):442-455.
5. Stewart SA, Bertuch AA. The Role of Telomeres and Telomerase in Cancer Research. *Cancer Res*. 2010 Oct 1;70(19):7365-7371.
6. Middleton G, Ghaneh P, Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP. New treatment options for advanced pancreatic cancer. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2008 Oct;2(5):673-696.
7. Shay JW, Keith WN. Targeting telomerase for cancer therapeutics. *British Journal of Cancer*. 2008;8:677-683.
8. Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Meo M, Buanes T, Gaudernack G. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study. *British Journal of Cancer*. 2006;95:1474-1482.
9. Röth A, Harley CB, Baerlocher GM. Imetelstat (GRN163L) – Telomerase-Based Cancer Therapy. *Recent Results Cancer Res*. 2010;184:221-234.



10. Bhagwandin VJ, Shay JW. Pancreatic cancer stem cells: Fact or fiction?. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1792:248-259.
11. Kyte JA. Cancer vaccination with telomerase peptide GV1001. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2009;18(5):687-694.
12. Shaw VE, Naisbitt DJ, Costello E, Greenhalf W, Park BK, Neoptolemos JP, Middleton GW. Current status of GV1001 and other telomerase vaccination strategies in the treatment of cancer. *Expert Rev. Vaccines*. 2010;9(9):1007-1016.
13. Marian CO, Wright WE, Shay JW. The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells. *Int. J. Cancer*. 2010;127:321-331.
14. Legemiddelverket [Internet]. Faser i klinisk utprøving av legemidler. [cited 2012 Feb 24]. Available from:  
[http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage\\_\\_\\_\\_29006.aspx?filterBy=CopyToIndustry](http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage____29006.aspx?filterBy=CopyToIndustry)
15. ClinicalTrials.gov [Internet]. Understanding Clinical Trials. [updated 2007 Sep 20; cited 2012 Feb 24]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/info/understand>
16. Dikmen ZG, Gellert GC, Jackson S, Gryaznov S, Tressler R, Dogan P, Wright WE, Shay JW. In vivo Inhibition of Lung Cancer by GRN163L: A Novel Human Telomerase Inhibitor. *Cancer Res*. 2005 Sep 1;65(17):7866-7873.
17. ClinicalTrials.gov [Internet]. Study of GRN163L With Paclitaxel and Carboplatin in Patients With Advanced or Metastatic Non Small Cell Lung Cancer. [updated 2012 Jan 24; cited 2012 Feb 24]. Available from:  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00510445?term=imetelstat&rank=6>
18. ClinicalTrials.gov [Internet]. Imetelstat as Maintenance Therapy After Initial Induction Chemotherapy in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). [updated 2011 Aug 26; cited 2012 Feb 24]. Available from:  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01137968?term=imetelstat&rank=1>
19. Joseph I, Tressler R, Bassett E, Harley C, Buseman CM, Pattamatta P, Wright WE, Shay JW, Go NF. The Telomerase Inhibitor Imetelstat Depletes Cancer Stem Cells in Breast and Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 2010 Nov 15;70(22):9494-9504.
20. Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G. Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother*. 2006;55:1553-1564.
21. Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, Sundstrøm S, Møller M, Nyakas M, Hansen GL, Gaudernack G, Aamdal S. Telomerase Peptide Vaccination in NSCLC: A Phase II Trial in Stage III Patients Vaccinated after Chemoradiotherapy and a 8-Year Update on a Phase I/II Trial. *Clin Cancer Res*. 2011;17(21):6847-57.
22. Buanes T, Maurel J, Liauw W, Hebbar M, Nemunaitis J. A randomized phase III study of gemcitabine (G) versus GV1001 in sequential combination with G in patients with unresectable and metastatic cancer (PC). *J Clin Oncol*. 2009;27:15.
23. ClinicalTrials.gov [Internet]. Gemcitabine and Capecitabine With or Without Vaccine Therapy in Treating Patients With Locally or Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer. [updated 2011 Aug 5; cited 2012 Feb 24]. Available from:  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00425360?term=gv1001&rank=7>